

Walidacja metod analitycznych chemicznych i mikrobiologicznych

Rafał Schmidt
Politechnika Koszalińska

Dominika Michna
Powiatowa Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna, Koszalin

1. Wstęp

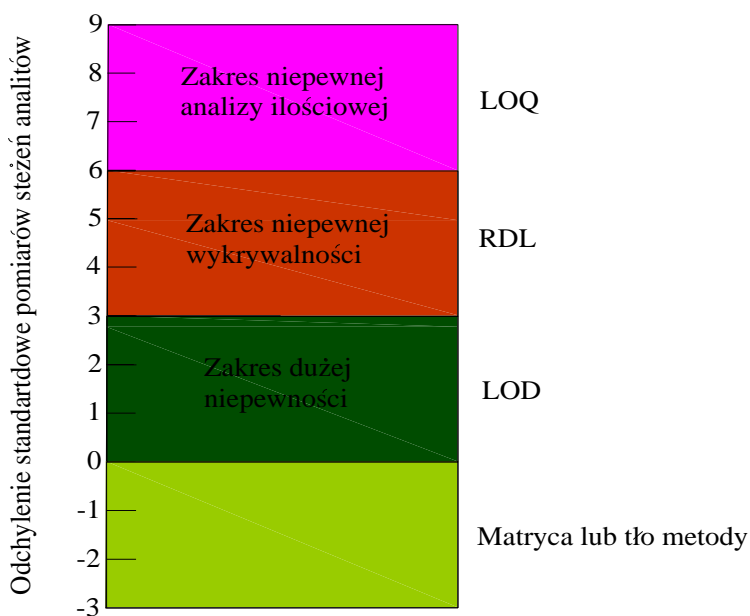
Jednym z podstawowych kierunków rozwojowych analityki i monitoringu zanieczyszczeń środowiska jest dążenie do oznaczania coraz mniejszych stężeń składnika w próbkach o złożonej matrycy. Tego typu zadanie jest wielkim wyzwaniem dla analityków i wymaga zwrócenia uwagi na kontrolę i zapewnienie jakości wyników badań [4÷6, 17, 19, 20]. Dokładność oznaczeń można osiągnąć stosując proces walidacji metody analitycznej z różnymi matrycami [3, 7, 22, 23, 28]. Walidacja metody jest procesem ustalenia czy charakterystyki techniczne metody analitycznej są odpowiednie do zamierzonego celu. Dla uzyskania najbardziej wiarygodnych wyników należy przeanalizować metodykę badawczą, w tym procedurę przygotowywania i pobierania próbek. Ważność metody można zweryfikować tylko poprzez badania międzylaboratoryjne [5, 11, 13, 14, 18, 29, 30, 37]. W skład procedury oszacowania jakości wchodzi zazwyczaj następujące elementy:

- kontrola i ocena dokładności uzyskiwanych wyników poprzez okresowe analizowanie próbek kontrolnych,
- ocena dokładności metody poprzez: analizę próbek certyfikowanych materiałów odniesienia, porównanie uzyskanych wyników z wynikami uzyskanymi dla tej samej próbki przy zastosowaniu metody odniesienia, wykonanie analiz próbek po dodaniu do nich wzorca, przeprowadzenie porównawczych badań międzylaboratoryjnych, stosowanie kart kontrolnych, stosowanie odpowiedniego systemu rewizji (auditingu).

Z walidacją metody analitycznej nierozzerwalnie związane są trzy parametry [5, 21, 28, 31, 32]:

- granica wykrywalności (LOD), zalecaną dolną granicą wartości tego parametru jest trzykrotna wartość odchylenia standardowego danej metody,
- granica wiarygodnej wykrywalności (RDL) – jej wartość powinna wynosić co najmniej sześciokrotną wartość odchylenia standardowego,
- granica oznaczalności (LOQ) czyli wartość uznana za najmniejszy wiarygodny (na poziomie prawdopodobieństwa wynoszącym co najmniej 99%) wynik oznaczenia daną metodą. Przyjmuje się, że wartość ta musi wynosić między 9 a 10s (s – odchylenie standardowe).

Zależność między tymi parametrami przedstawiono na rysunku 1 [15]. Niezwykle istotnym parametrem jest dokładność metody, którą charakteryzuje błąd bezwzględny certyfikowanego materiału odniesienia i otrzymanego wyniku walidowanej metody [11, 13, 34, 36, 38].



Rys. 1. Schemat zależności między podstawowymi parametrami charakteryzującymi określoną metodykę analityczną [15]

Fig. 1. Diagram of dependence between basic parameters characterizing the definite analytic methodology [15]

Materiałem odniesienia jest substancja której jedna lub więcej właściwości są wystarczająco homogeniczne i dobrze zbadane by można go było zastosować do kalibracji przyrządów pomiarowych, oceny metod analitycznych czy też oszacowania wartości innych przyrządów analitycznych [14, 15, 28, 37]. Natomiast certyfikowany materiał odniesienia jest to materiał z odniesienia z dołączonym certyfikatem, którego jedna lub więcej właściwości są poświadczone w wyniku zastosowania procedury badawczej, która zapewniła odniesienie do dokładnego wzorca jednostki miary (traceability), wyrażającej daną właściwość z jednoczesnym podaniem dla każdej certyfikowanej właściwości wartość niepewności na określonym poziomie ufności, który zazwyczaj wynosi 95%. W zależności od stosowanej metody ten błąd nie może przekroczyć 20%, tj. odzysk oznaczanego analitu w granicach 80 do 120% [11, 13, 17]. W chwili obecnej rozróżnia się trzy rodzaje materiałów odniesienia:

- składu chemicznego,
- właściwości fizycznych,
- specjalnych właściwości technicznych.

Zakres badań w inżynierii środowiska rozwija się w wielkim stopniu dlatego niewystarczające jest przedstawianie „suchych wyników badań” niezbędne jest także udowodnienie iż otrzymane zależności (wyniki badań) zostały wykonane za pomocą metod pewnych – zwalidowanych. Ponieważ brak jest dokładnej metodyki przeprowadzenia procesu walidacji metody badawczej dlatego celem pracy jest przedstawienie możliwości przeprowadzenia walidacji z zastosowaniem zarówno metod chemicznych jak i mikrobiologicznych.

2. Walidacja metod chemicznych

W prezentowanej pracy przedstawiono jeden z kilku możliwych sposobów przeprowadzenia procesu walidacji metody analitycznej. Inaczej mówiąc walidacja jest procesem, której celem jest:

- zapewnienie, że niepewność wyniku jest możliwa do zaakceptowania przez odbiorcę wyniku,
- oszacowanie wpływu różnych czynników (instrumentalnego, ludzkiego, środowiskowego) na niepewność wyniku,
- wskazanie, że metoda jest odpowiednia do osiągnięcia założonego celu.
- Walidację stosuje się, gdy [7, 11, 14, 30, 37]:
- opracowuje się nową metodę,
- wprowadza się zmiany w metodzie,
- parametry metody zmieniają się w czasie,
- ustaloną metodę wykorzystuje się w innym laboratorium albo przez innych analityków, albo za pomocą innych przyrządów.

Walidacja metody obejmuje oszacowanie następujących parametrów [7, 11, 14, 15, 18, 28, 30, 37]:

- granica wykrywalności,
- granica oznaczalności,
- powtarzalność,
- odtwarzalność,
- odporność na zmianę warunków,
- poprawność (obciążenie, błąd systematyczny całkowity),
- selektywność, specyficzność,
- odzysk,
- zakres liniowości,
- czułość,
- niepewność,
- dokładność.

2.1. Granica wykrywalności

Jest to najmniejsza zawartość substancji, którą można wykryć z 95% pewnością statystyczną [5, 9, 10, 13, 18] wg wzoru (1).

$$x_L = x_{bl} + k \cdot s_{bl} \quad (1)$$

gdzie:

- x_L – granica wykrywalności,
- x_{bl} – średnia z pomiarów dla ślepych próbek (analiza powinna obejmować co najmniej 20 pomiarów),
- s_{bl} – odchylenie standardowe obliczone z wyników dla próbek ślepych,
- k – współczynnik liczbowy, którego wartość zależy od żadanego poziomu ufności przeważnie wartość ta wynosi od 2 do 3.

Granice wykrywalności oblicza się na podstawie uzyskanych danych z absorbancji lub ze stężenia.

2.2. Granica oznaczalności

Jest to najmniejsze stężenie substancji, które można oznaczyć z dopuszczalną precyzją i dokładnością w ustalonych warunkach badania [5, 6, 10, 13, 18] wg wzoru (2).

$$x_{Lo} = k_o s_o \quad (2)$$

gdzie:

x_{Lo} – granica oznaczalności

s_o – odchylenie standardowe przy stężeniu x_{Lo} (s_o nie powinno być większe niż 10% x_{Lo})

k_o – mnożnik, którego wartość nie jest jednoznacznie ustalona, $5 \div 10$

2.3. Powtarzalność i odtwarzalność (precyzja)

Powtarzalność określana jest przez rozrzut wyników uzyskanych:

- tą samą procedurą pomiarową i tym samym przyrządem przez tę samą osobę,
- w tym samym laboratorium, w krótkich odstępach czasu.

Odtwarzalność określana jest przez rozrzut wyników uzyskanych:

- przez różne laboratoria (odtworzalność międzylaboratoryjna),
- w jednym laboratorium, lecz w różnych odstępach czasu (odtworzalność wewnątrzlaboratoryjna) przez różne osoby i za pomocą różnych przyrządów.

Miarą precyzji jest *odchylenie standardowe* [5÷7, 14, 15, 34, 37] wyznaczone w wyżej zdefiniowanych warunkach. Służy do obliczenia granicy powtarzalności i odtwarzalności zgodnie z wyrażeniami wg wzoru (3):

$$r = 2,8 \cdot s_r \quad , \quad R = 2,8 \cdot s_R \quad (3)$$

gdzie:

s_r – odchylenie standardowe powtarzalności,

R – odchylenie standardowe odtwarzalności.

Wygodniejsze jest używanie odchylenia standardowego, ponieważ przeważnie ma stałą wartość, jeżeli rozpatruje się niezbyt duży zakres wartości.

2.4. Odporność na zmianę warunków

Ocena odporności metody polega na wyodrębnieniu takich etapów procedury, których zmiana może mieć wpływ na wynik [5, 13, 28, 38]. Może to być, na przykład, czas reakcji prowadzącej do wywołania barwy lub czas trwałości zabarwienia. Wykonanie analiz roztworu o tym samym stężeniu lecz różnym czasie reakcji, da odpowiedź na pytanie, czy czas ten ma wpływ na poprawność lub precyzję wyniku. Planując eksperymenty należy pamiętać, że równocześnie można zmieniać tylko jedną wielkość.

2.5. Poprawność (obciążenie, błąd systematyczny całkowity)

W celu sprawdzenia poprawności i oceny obciążenia metody stosuje się różne sposoby postępowania, do których przede wszystkim należą [11, 13, 14, 15, 18, 37]:

- ocena wyników analiz certyfikowanych materiałów odniesienia lub materiałów odniesienia;
- metoda dodatków wzorca do próbki badanego obiektu, w tym:
 - a) próbek badanego obiektu, które były już poddane analizie i oznaczono w nich pewne stężenia danej substancji lub
 - b) próbek czystej matrycy niezawierającej badanej substancji,

Przed przystąpieniem do sprawdzenia poprawności metody przy określonym jej zakresie oznaczalności należy upewnić się, czy przygotowane w laboratorium materiały odniesienia są jednorodne i wykazują wystarczającą trwałość w czasie przewidzianym do wykonania całości doświadczenia. Jeżeli badano co najmniej pięć różnych stężeń danej substancji (odniesienia), to oceniając zależność między wartościami odniesienia a wynikami analiz można zastosować równanie regresji liniowej. Wykres mierzonych wartości jako funkcja teoretyczna stężenia powinien być liniowy ze współczynnikiem nachylenia (b) równym jedności i stałą przesunięcia (a) równą zero. Różna od zera stała przesunięcia (a) występuje w przypadku stałych błędów systematycznych. Błąd stały jest niezależny od ilości lub stężenia substancji badanej [5]. Wykrycie przyczyn błędu systematycznego popełnianego w trakcie analizy może przyczynić się do jego eliminacji poprzez wprowadzenie odpowiedniego współczynnika korygującego, czyli tzw. poprawki. Powinien być jednak spełniony warunek, że wielkość błędu jest proporcjonalna do zmiany mierzonej ilości lub stężenia badanej substancji. Błąd stały, pochodzący np. z odczytników, może być korygowany na etapie odczytu wyniku analizy, tj., jeśli funkcja wzorcowania (w analizie instrumentalnej) ma odpowiednią postać np. $y = a + bx$, to wówczas, jak wynika z równania wartość odczytu sygnału analitycznego próbki Y jest korygowana o wartość współczynnika przesunięcia a . Najprościej błędy systematyczne, czyli obciążenie metody, można obliczyć z równania (16), w którym wartość „prawdziwą” – μ_0 należy zastąpić wartością nominalną materiału odniesienia x_0 (c_{ref}), czyli wg wzoru (4):

$$\text{Obciążenie (B}_w) = \frac{|x_i - x_0|}{x_0} \text{ lub } 1 - RR \quad (4)$$

gdzie:

RR – współczynnik odzysku badanego składnika z matrycy.

W praktyce laboratoryjnej, jeśli nie ma innych źródeł błędów systematycznych, poprawność metody najczęściej związana jest z niepełnym odzyskiem badanego składnika (analitu) z danej matrycy [5÷7, 14, 15, 23, 26, 37, 38]. Przepis analityczny takiej metody powinien uwzględnić oznaczanie odzysku badanego składnika z matrycy. Jeżeli do oceny wyników badania odzysku analitu z matrycy nie stosuje się metody regresji liniowej, to ewentualną poprawkę można obliczyć zgodnie z równaniem wg wzoru (5):

$$RR = \frac{x_i - (C_z)}{x_0} \quad (5)$$

gdzie:

RR – współczynnik odzysku badanego składnika z matrycy,

x_0 – stężenie (nominalne) analitu w materiale odniesienia,

x_i – stężenie analitu oznaczone w materiale odniesienia,

c_z – ewentualne zakłócenie pochodzące z tła (matrycy wolnej od analitu).

W celu stwierdzenia istotności różnic pomiędzy stężeniem badanego składnika w materiale odniesienia, a oznaczonym należy przeprowadzić testowanie za pomocą testu t-Studenta ($P = 0,95$), sprawdzając hipotezę H_0 , czy odzysk różni się od jedności (100%), czyli $H_0 : RR = 1$; $H_1 : RR \neq 1$. Stosując właściwy model testu t-Studenta, wartość statystyki t oblicza się wg równania (6):

$$t = \frac{|1 - RR|}{RR \cdot u_{cwzRR}} \quad (6)$$

gdzie:

$RR \cdot u_{cwzRR}$ – niepewność złożona współczynnika odzysku

2.6. Selektowność, specyficzność

Parametry te oceniane są na etapie opracowania metody i podawane w normach jako czynniki przeszkadzające [5, 13÷15, 28].

2.7. Odzysk

Jest to część substancji [%] dodanej przed analizą do badanej próbki [5, 6, 10, 13, 17], określona na podstawie pomiaru substancji w próbce wzbogaconej i nie wzbogaconej wg wzoru (7):

$$R[\%] = 100 \cdot \left[\frac{c_2 - c_1}{c_d} \right] \quad (7)$$

gdzie:

R – odzysk,

c_1 – stężenie substancji w próbce nie wzbogaconej,

c_2 – stężenie substancji w próbce wzbogaconej,

c_d – stężenie substancji dodanego do próbki.

2.8. Dokładność

Dokładność (D) metody określa się jako różnicę między zmierzoną wartością x a wartością „rzeczywistą” (y) [1, 2, 5, 6, 13, 16, 17, 33, 35, 37]. Miarą dokładności może być błąd bezwzględny obliczany na podstawie wzoru (8):

$$D = x - y \quad (8)$$

Błąd bezwzględny może mieć znak dodatni, gdy $x > y$ lub ujemny, gdy $x < y$. Często błąd bezwzględny wyraża się nie zwracając uwagi na znak, obliczając jako wartość bezwzględną czyli (9):

$$D = |x - y| \quad (9)$$

W przypadku posługiwania się wartością średnią, jako „prawdziwą”, błąd bezwzględny wyraża się w postaci (10):

$$D = |x_{\text{sr}} - y| \quad (10)$$

Błąd względny (relatywny) opisuje się równaniem (11):

$$D_{\text{rel}} = \frac{|x - y|}{y} \quad (11)$$

i często w praktyce analitycznej wyraża w procentach (12):

$$D_{\text{rel}} = \left(\frac{|y - x|}{y} \right) \cdot 100 \quad (12)$$

Powiązania pojęć charakteryzujących wynik (metodę) badania z występowaniem różnego rodzaju błędów przedstawia poniższy schemat:

Dokładność = Poprawność + Precyzja

Dokładność, więc jest to [2, 5, 6, 10, 11, 23, 24, 35, 36]:

- zgodność między wartością znaną (z oszacowaną niepewnością) a wartością będącą wynikiem analizy,
- wielkość jej błędu systematycznego,
- metoda niedokładna może być obarczone błędem systematycznym stałym (niezależnym od poziomu zawartości oznaczanego składnika) i zmiennym (zależnym od stężenia oznaczanego składnika). Dokładność powinna być oszacowana na podstawie minimum 10 wyników oznaczeń dla minimum trzech różnych poziomów stężeń z badanego zakresu.

2.9. Zakres liniowości

Zakres stężeń substancji, w którym metoda daje wyniki badań proporcjonalne do stężenia substancji. Liniowość ocenia się wizualnie oraz przez wyznaczenie współczynnika regresji liniowej. Precyzję kalibracji w analizie instrumentalnej dobrze charakteryzują parametry krzywej wzorcowej opisane równaniem regresji $y = a + bx$, takie jak resztowe odchylenie standardowe (punktów wartości mierzonych od linii prostej) s_y oraz współczynnik nachylenia (czułość) b . Jakość pomiaru instrumentalnego polepsza się, gdy wzrasta czułość i zmniejsza się odchylenie standardowe s_y . Odchylenie standardowe metody (kalibracji) s_m uwzględnia wpływ na jakość analizy parametrów s_y i b . Precyzję najlepiej wyrazić w postaci współczynnika zmienności, który daje możliwość względnego porównania różnych technik np. instrumentalnych, stosowanych do analizy tego samego czynnika [5÷7, 13÷15, 17, 28, 37]. Do oceny istotności różnic precyzji stosuje się test F–Snedecora. Współczynnik zmienności oblicza się w procentach wg równania (13):

$$V_m = \frac{S_m}{x} \cdot 100 \quad \text{lub} \quad V_m = \frac{S_y}{b \cdot x_{\text{śred}}} \cdot 100 \quad (13)$$

Nie w każdym przypadku wiadomo z góry, czy uzasadnione jest przyjęcie hipotezy o liniowej zależności. W celu rozstrzygnięcia tego problemu należy dla każdej z m zadanych wielkości wykonać n_j równoległych pomiarów. Otrzymamy przy tym błąd losowy w przypadku, gdy prawidłowo wybrano zależność liniową, nie powinien być istotnie różny od rozrzutu zmierzonych wartości względem linii regresji (linii prostej). Założenie to sprawdza się za pomocą analizy wariancji wg wzoru (14):

$$F = \frac{\text{wariancja „ rozrzut wartości średnich”}}{\text{wariancja „ rozrzut wewnątrz oznaczeń równoległych”}} \quad (14)$$

W praktyce laboratoryjnej do oceny liniowości wykorzystuje się współczynnik regresji r , przyjmując arbitralnie wartość graniczną dla tego współczynnika np. nie mniejszy niż 0,999. Jeśli wartość r jest mniejsza od 0,999, należy rozważyć występowanie regresji nieliniowej różnej od regresji liniowej typu $y = a + bx$. Po dokonaniu odpowiednich przekształceń, tzn. sprowadzeniu modelu nieliniowego do postaci liniowej, należy wybrać typ równania regresji o największym, istotnym statystycznie współczynniku korelacji [5, 6, 14, 15]. W przypadku oznaczania substancji głównej współczynnik korelacji r powinien być większy od 0,995, natomiast w przypadku oznaczania zanieczyszczeń powinien być większy od 0,98. Aby określić zakres liniowości należy wykonać minimum 5 serii wzorców (po 3÷6) powtórzeń, których stężenia obejmują 80÷120% stężenia spodziewanego w próbce.

2.10. Czułość

Jest to zmiana odpowiedzi przyrządu na zmianę stężenia substancji. Na przykład w spektrofotometrii czułość można wyrazić jako (15):

$$k_x = (A_2 - A_1)/(c_2 - c_1) \quad (15)$$

gdzie:

A_1 i A_2 – wartości absorpcji światła odpowiednio dla natężenia c_1 i c_2 .

Granica wykrywalności i granica oznaczania ilościowego zależą od czułości metody. Znana jest też inna definicja czułości, która określa ją jako różnicę stężenia (lub zawartości) oznaczanego składnika, odpowiadającą najmniejszej różnicy odpowiedzi jaką można wykryć. W analizie klasycznej czułość metody związana jest z czułością reakcji chemicznej lub czułością wagi analitycznej. Czułość reakcji analitycznej jest to właściwość reakcji określona przez

najmniejszą ilość substancji, która może być wykryta za pomocą danej reakcji. Parametrami charakteryzującymi czułość liczbowo są stężenie graniczne i minimum wykrywalne. Stężenie graniczne jest to najmniejsze stężenie substancji w roztworze, przy którym można ją jeszcze wykryć daną metodą. Stężenie graniczne określa się stosunkiem masy substancji wykrywanej (zwykle 1 g) do masy (objętości) rozpuszczalnika. W analizie instrumentalnej czułość przedstawia kąt nachylenia krzywej wzorcowej i można ją obliczyć metodą najmniejszych kwadratów [3, 5, 12÷14, 22, 25, 37, 38].

2.11. Niepewność

Parametr związany z wynikiem pomiaru, charakteryzujący rozrzut wartości, które można w uzasadniony sposób przypisać wielkości mierzonej. Przy oszacowywaniu niepewności należy brać pod uwagę [5, 6, 11, 14, 15, 37, 38]:

- całkowitą precyzję metody,
- całkowity błąd systematyczny i jego niepewność,
- niepewność wzorcowania.

Podstawowymi źródłami niepewności w trakcie badania próbek z wykorzystaniem odpowiedniej procedury analitycznej mogą być:

- błędnie lub nieprecyzyjnie zdefiniowana wielkość oznaczenia,
- nie prawidłowy wybór materiałów odniesienia,
- wahania w trakcie powtórzeń pomiarów,
- brak spełnienia wymogu reprezentatywności dla pobranej próbki,
- nieznaną wpływ wszystkich warunków zewnętrznych na wynik pomiaru analitycznego.

Wg Guide to the Expression of Uncertainty In Measurement (GUM) w celu określenia niepewności wyniku analizy należy [3, 4, 6, 8, 13, 15, 27, 39, 40]:

- zdefiniować procedurę pomiarową i wielkość oznaczaną,
- opracować model, najczęściej w postaci matematycznej), służący do obliczenia wyniku analizy na podstawie mierzonych parametrów.

3. Walidacja metod mikrobiologicznych

Walidacja powinna symulować badania rutynowe tak dokładnie, jak tylko to możliwe. Dlatego podczas walidacji nie są wskazane badania oparte na sztucznych próbkach: certyfikowanych materiałach odniesienia czy próbkach domieszkowych – chyba, że próbki naturalne badane przez laboratorium są w większości czyste mikrobiologicznie. Próbki o bardzo niskiej liczbie bakterii są niewłaściwe z punktu widzenia walidacji dla większości metod, pomimo że

badanie na tym poziomie zanieczyszczeń interesują analityka w związku z koniecznością weryfikacji zgodności wyników z wymaganiami i ich niepewności w zakresie wartości granicznych. Jednak w celu poznania prawdziwej natury stosowanych metod w próbce musi być wystarczająco dużo drobnoustrojów tak, aby na wynik badania jak najmniejszy wpływ miało ich przypadkowe rozmieszczenie [13÷15, 17, 22, 23, 37].

Wybór sposobu walidacji zależy od rodzaju metody – czy jest to metoda:

- jakościowa,
- ilościowa określająca ogólna liczbę komórek,
- ilościowa selektywna.

Parametry charakterystyki metody jakościowej [3, 5, 6, 11, 13÷15, 17, 18, 23, 37] są następujące:

- dokładność – procent próbek poprawnie zidentyfikowanych,
- zgodność wyników w laboratorium – odpowiada powtarzalności metod ilościowych,
- zgodność wyników między laboratoriami – odpowiada odtwarzalności metod ilościowych,
- specyficzność – zdolność metody do selekcji i wyróżniania poszukiwanych mikroorganizmów ze wszystkich innych w tym samym środowisku,
- selektywność - zdolność metody umożliwiająca rozwój typowego organizmu przy jednoczesnym powstrzymaniu rozwoju nietypowych mikroorganizmów,
- granica wykrywalności – najmniejsza liczba mikroorganizmów w badanej próbce, którą można wykryć ale niekoniecznie określić ilościowo z odpowiednią dokładnością.

Parametry charakterystyki metody ilościowej [5, 13÷15, 17, 19, 21, 28, 34, 37]

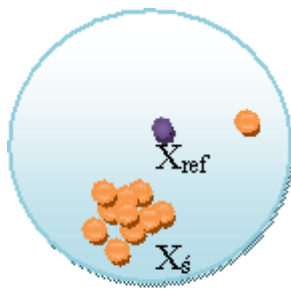
- dokładność – powinna być oszacowana dla różnych poziomów zanieczyszczeń badanego zakresu,
- poprawność,
- precyzja – powtarzalność,
- precyzja – odtwarzalność,
- niepewność wyniku,
- specyficzność,
- selektywność,
- granica oznaczalności,
- zakres.

3.1. Dokładność

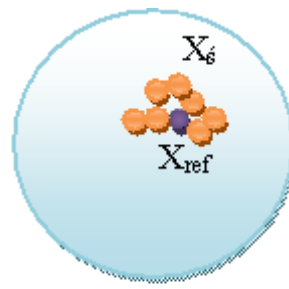
W badaniach mikrobiologicznych dokładność jest określana tym samym terminem co w badaniach chemicznych. W badaniach mikrobiologicznych podobnie jak i chemicznych dokładność metody powinna być oszacowana dla różnych poziomów zanieczyszczeń badanego zakresu [5, 6, 9, 14, 15, 18, 19, 21].

Sposoby szacowania dokładności badań mikrobiologicznych:

- przez analizę próbek o znanym stężeniu (np.: certyfikowany materiał odniesienia) i porównanie wyników uzyskanych daną metodą z wartością prawdziwą otrzymana dla certyfikowanego materiału,
- przez porównanie wyników uzyskanych daną metodą z wynikami otrzymanymi metodą odniesienia, której dokładność jest znana, np.: metodą wcześniej walidowaną,
- w przypadku gdy certyfikowany materiał odniesienia nie jest dostępny dopuszczalne jest dodanie znanej ilości substancji do badanej próbki, a następnie jego oznaczenie daną metodą.



Precyzja
Precision



Poprawność
Correctness

Walidacja metody poszukuje ilościowego określenia dokładności wyników za pomocą oszacowania zarówno błędów systematycznych jak i przypadkowych czynników wpływających na wyniki [5, 7, 9, 11, 13, 17, 23, 24, 25, 26, 28]. Tak więc w badaniach mikrobiologicznych na dokładność metody ma wpływ poprawność i precyzja. Poprawność jest to stopień zgodności między wartością średnią otrzymaną na podstawie dużej serii wyników badania i przyjętą wartością odniesienia, natomiast precyzja jest to ścisła zgodność pomiędzy niezależnymi wynikami badań uzyskanymi w żądanych warunkach [5].

3.2. Powtarzalność i odtwarzalność

Powtarzalność to najmniejsza oczekiwana precyzja gdy metodę stosuje jeden analityk w tych samych warunkach badania w krótkim odstępie czasu jeżeli powtarza analizę jednej próbki [5, 6, 9, 11, 14, 15, 31, 37]. Na podstawie odchylenia standardowego powtarzalności oblicza się granicę powtarzalności, która pozwala określić różnicę pomiędzy powtórzonymi analizami wykonanymi w warunkach powtarzalności. Odtwarzalność to największa miara precyzji jeżeli próbki analizuje kilka laboratoriów w celu porównania wyników badania.

3.3. Selektywność i specyficzność

Selektywność jest to zdolność metody umożliwiająca rozwój typowego organizmu przy jednoczesnym powstrzymaniu rozwoju nietypowych mikroorganizmów. W ten sposób zostaje zminimalizowany problem przerostu kolonii. Specyficzność natomiast jest to zdolność metody do selekcji i wyróżniania poszukiwanych mikroorganizmów ze wszystkich innych w tym samym środowisku [3, 5, 6, 11, 13, 28, 31, 38].

3.4. Szacowanie niepewności

Badania mikrobiologiczne zaliczają się do tej kategorii metod która uniemożliwia ściśle statystyczne i metrologiczne podejście do szacowania i wyrażania niepewności wyników badania. Ogólnie przyjęte podejście aby oprzeć oszacowanie niepewności wyniku badania wyłącznie na badaniu powtarzalności i odtwarzalności wyników poprzez wykonywanie wielokrotnych analiz jest podejściem słusznym [5, 13÷15, 34, 39, 40]. Idealnie byłoby gdyby oszacowania te zawierały błąd systematyczny oszacowane np. na podstawie wyników uzyskiwanych przez laboratorium w badaniach biegłości.

3.5. Miary rozproszenia wyników

Miary rozproszenia wyników określają różnice pomiędzy poszczególnymi wynikami badania a wartością średniej arytmetycznej. Najczęściej spotykane miary rozproszenia to [4, 5, 11, 13, 28, 37, 39, 40]:

- wariancja,
- odchylenie standardowe,
- względne odchylenie standardowe,
- współczynnik zmienności,
- rozstęp.

Wariancja jest to średnia arytmetyczna kwadratów odchyleń poszczególnych wartości cechy od średniej arytmetycznej zbiorowości. Wariancja jest więc sumą kwadratów różnic między zaobserwowanymi wartościami w próbkach

a ich wartością średnią podzieloną przez liczbę o jeden mniejszą niż liczba obserwacji. Odchylenie standardowe określa przeciętne zróżnicowanie poszczególnych wartości cechy od średniej arytmetycznej. Jest to dodatni pierwiastek kwadratowy z wariancji w próbce. Względne odchylenie standardowe (RSD) jest to stosunek odchylenia standardowego w próbce do wartości średniej w próbce. Rozstęp (R) definiuje się jako różnicę między największą i najmniejszą zaobserwowaną wartością. Natomiast współczynnik zmienności (CV) określany jest jako stosunek odchylenia standardowego do wartości średniej i wyrażany jest w procentach.

3.6. Czulość metody

Czulość jest to zdolność do wykrywania nieznaczących zmian w liczbie mikroorganizmów w obrębie danej matrycy. Stosując różne matryce, czulość metody może się zmieniać w niewielki zakresie [6, 12, 13, 17, 32, 34, 37, 40].

4. Badania międzylaboratoryjne

Warunkiem uzyskania wiarygodnych wyników jest stosowanie substancji porównawczych i pomocniczych o odpowiedniej, znanej czystości (materiały certyfikowane), stosowanie sprawdzonej aparatury, wykonywanie badań przez personel o odpowiednich kwalifikacjach, dokumentowanie każdego etapu walidacji oraz badania międzylaboratoryjne. Badania takie umożliwiają ocenę wyników badań prowadzonych z wykorzystaniem takich samych bądź też podobnych próbek testowych przez co najmniej dwa laboratoria [5, 11, 13, 18, 30, 31, 37]. Podstawą do statystycznej oceny danego laboratorium uczestniczącego są parametry statystyki indywidualnej i sumarycznej sprawności. Jednym z parametrów statystyki indywidualnej jest standaryzowany współczynnik Z (reszta standaryzowana). Jest to najszerzej stosowana formuła oceny indywidualnej sprawności. Obliczany jest oddzielenie dla każdego punktu pomiarowego. Wyróżnić można współczynnik Z i zmodyfikowany współczynnik Z:

$$Z = \frac{X_{LAB} - X_{ODN}}{s} \quad (16)$$

gdzie:

X_{LAB} – wynik uzyskany przez dane laboratorium

X_{ODN} – wartość przyjęta/wartość odniesienia,

S – odchylenie standardowe.

Wartość współczynnika Z reprezentuje standardowy rozkład normalny w przypadku, gdy wartość przyjęta/odniesienia X_{ODN} jest średnią, a S jest odchyleniem standardowym. Wartość zmodyfikowanego współczynnika Z , który można obliczyć na podstawie wzoru (17):

$$Z = \frac{X_{LAB} - X_{ODN}}{S'} \quad (17)$$

gdzie:

X_{LAB} – wynik uzyskany przez dane laboratorium,

X_{ODN} – wartość przyjęta/wartość odniesienia,

$$S' = \sqrt{S^2 + U_{X_{Odn}}^2} \quad (18)$$

gdzie:

S – odchylenie standardowe,

$U_{X_{Odn}}^2$ – niepewność wartości średniej/wartości odniesienia.

Ocena sprawności jest następująca:

- $|z| \leq 2$ – ocena laboratorium jest zadowalająca, dane laboratorium wykonuje pomiary prawidłowo,
- $2 < |z| < 3$ – pomiar wątpliwy, oznacza to, że do pomiarów wykonywanych przez dane laboratorium można mieć zastrzeżenia,
- $|z| \geq 3$ – wynik niezadowalający, wyniki pomiarów uzyskane przez laboratorium uznawane są za niewiarygodne.

5. Podsumowanie

Walidacja metod chemicznych i mikrobiologicznych obejmuje testowanie istotnych cech charakterystycznych metody. Laboratorium, aby spełnić odpowiednie kryteria powinno ustanowić, wdrożyć, utrzymywać i rozwijać system jakości, właściwy dla zakresu jego działalności z uwzględnieniem wszystkich podejmowanych działań i rodzajów badań. System jakości w laboratorium powinien być odpowiedni do rodzaju i ilości wykonywanych badań. Podczas analizy próbek trzeba walidować dane. Proces ten obejmuje zarówno dokumentację oraz kontrolę nienaruszalności danych i ich identyfikowalności. Raport z walidacji metod analitycznych powinien zawierać m.in.:

- przedmiot i zakres walidacji,
- rodzaj oznaczanych związków i stosowanych matryc,
- opis i charakterystyka metody badawczej,

- kryteria akceptacji,
- postępowanie statystyczne i obliczenia (zalecana metodą i coraz częściej stosowaną jest metoda ANOVA, którą można wykonywać za pomocą programu Statistica),
- kryteria rewalidacji,
- podsumowanie i wnioski.

Stosowanym sposobem, umożliwiającym wsteczną identyfikację danych, od wyników końcowych do danych pierwotnych, pod kątem ich nienaruszalności, jest pełny audit systemu zbierania i obróbki danych.

Literatura

1. **Astel A., Astel K., Biziuk M., Namieśnik J.:** Pol. J. Environ. Stud., 15, 691, 2006.
2. **Astel A., Mazerski J., Namieśnik J.:** *Wykorzystanie technik chemometrycznych w badaniach analitycznych środowiska.* Gdańsk 2003.
3. **Bartulewicz J., Gawłowski J., Bartulewicz E.:** *Pobieranie i przygotowywanie próbek do analizy zanieczyszczeń organicznych metodami chromatografii.* Państwowa Inspekcja Ochrony Środowiska. Warszawa 1997.
4. **Bulska E., Taylor P.D.P.:** *Wybrane aspekty metrologii chemicznej.* Gdańsk 2003.
5. **Dobecki M.:** *Zapewnienie jakości analiz chemicznych.* Poradnik dla laboratoriów Państwowej Inspekcji Sanitarnej. Instytut Medycyny Pracy im. Prof. Nofera w Łodzi 2004.
6. AOAC PEER: Verified Methods Program, Manual on policies and procedures. Arlington, VA., 1993.
7. **Caulcutt R., Boddy R.:** *Statistics for Analytical Chemist.* Chapman and Hall, London 1983.
8. **Dedina J., Tsalev D.L.:** *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry.* Wiley-VCH, Waszyngton, 1995.
9. **Czermiński J. B., Iwasiewicz A., Paszek Z., Sikorski A.:** *Metody statystyczne dla chemików.* Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1986.
10. **Doerffel K.:** *Statystyka dla chemików analityków.* WNT, Warszawa, 1989.
11. EAL-P11, Validation of test methods. EAL, 1997.
12. **Elison S.L.R., King B., Rossein M., Salit M., Williams A.:** *Eurachem/CITAC Guide: Traceability in Chemical Measurement.* Eurachem/CITA 2003.
13. EURACHEM/CITAC (2000): Przewodnik. Wyrażanie niepewności pomiaru analitycznego. Biuletyn Informacyjny POLLAB 2002.
14. **Huber L.:** *Validation and qualification in analytical laboratories.* Interpharm Press, Inc. 1999.
15. **Huber L.:** *Dobra praktyka laboratoryjna w analizie instrumentalnej.* Państwowa Inspekcja Ochrony Środowiska. Warszawa 1997.
16. **Hulanicki A.:** *Specjacja w wodach i osadach dennych-tematyka zbieżna czy rozbieżna?.* Analiza specjacyjna metali w próbkach wód i osadów dennych red. J. Siepak, Poznań 1998.

17. **Funk W., Dammann V., Donnevert G.:** *Quality Assurance in Analytical Chemistry VCH*. 1995.
18. IUPAC/ISO/AOAC: Harmonised Guidelines for Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories. Technical Report., Pure and Appl. Chem., 1995r.
19. **Konieczka P., Namieśnik J.:** *Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych*. WNT. Warszawa 2007.
20. **Mazerski J., Dyszkowski M.:** *Chemometria*. Instytut Ochrony Roślin. Poznań 2006.
21. Manual of Food Quality Control. 1. The Food Control Laboratory, FAO Food and Nutrition Paper. 14/1 Rev 1, Rome 1986.
22. **Namieśnik J., Pilarczyk Z., Torres L.:** *Przygotowywanie próbek środowiskowych do analizy*. WNT. Warszawa 2000.
23. **Namieśnik J.:** *Trendy w analityce i monitoring środowiska*. Gdańsk 2003.
24. **Namieśnik J.:** Crit. Rev. Anal. Chem. No 32. 2002.
25. **Namieśnik J.:** Crit. Rev. Anal. Chem. No 30. 2000.
26. **Namieśnik J.:** Pol. J. Environ. Stud. 10. 2001.
27. **Niedzielski P., Siepak J.:** *Analiza specjacyjna metali*. Wyd. UAM Poznań 1998.
28. NMKL Report No 8: Quality assurance principles for chemical food laboratories. Nordic Council of Ministers. Copenhagen, Nord 1990: 48E.
29. **Berthouex P. Mac, Linfield C.B.:** *Statistics for Environmental Engineers*. Second editio. CRC Press Company. New York, Washington 2002.
30. Polityka Polskiego Centrum Akredytacji dotycząca zapewnienia spójności pomiarowej. PCA. Warszawa 2003.
31. Polityka ILAC dotycząca zapewnienia spójności pomiarowej wyników pomiarów. PCA. Warszawa 2002.
32. **Pyrzyńska K.:** *Analyst*, 121, 77R 1996.
33. **Pyrzyńska K.:** *Specjacja selenu w wodach naturalnych*. Analiza specjacyjna metali red. J. Siepak, Wyd. UAM, Poznań, 1998.
34. PN-ISO 5725-1,2,3,4,5,6: Dokładność (poprawność i precyzja) metod pomiarowych i wyników pomiarów. Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa 2002.
35. **Siepak M., Przybyłek J., Niedzielski P.:** *Zastosowanie analizy specjacyjnej mikropierwiastków w badaniu przepływu wód podziemnych w porowym środowisku hydrogeologicznym doliny Warty w rejonie ujęcia wody Mosina-Krajkowo*. Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, Łódź 2005.
36. **Urbaniak M.:** *Zarządzanie jakością – Teoria i praktyk*. Difin. Warszawa 2004.
37. US. EPA, Guidance for methods development and methods validation for the Resource Conservation and Recovery Act (RCRA) Program, Washington, D. C. 1995.
38. **Wolak W., Leboda R., Hudnicki Z.:** *Metale ciężkie w środowisku i ich analiza*. Państwowa Inspekcja Ochrony Środowiska. Chełm 1995.
39. Wyrażenie niepewności pomiaru przy wzorcowaniu, dokument EA-4/02, Europejska Współpraca w dziedzinie Akredytacji 1999.
40. Wprowadzenie problematyki niepewności pomiaru w badaniach w związku z wejściem do stosowania normy ISO/IEC 17025, ILAC-G17:2002, PCA. Warszawa 2002.